

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/001504

International filing date: 02 February 2005 (02.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-026237
Filing date: 03 February 2004 (03.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 March 2005 (24.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

03. 2. 2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 2 月 3 日

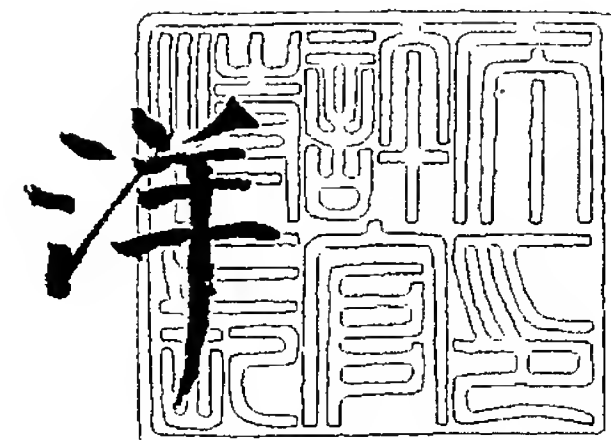
出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 2 6 2 3 7
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 2 6 2 3 7]

出 願 人
Applicant(s): 旭化成株式会社

2 0 0 5 年 3 月 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 X1031291
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 34/543
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島 2 番地の 1 旭化成株式会社内
 【氏名】 松山 健二
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島 2 番地の 1 旭化成株式会社内
 【氏名】 渡邊 勝哉
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島 2 番地の 1 旭化成株式会社内
 【氏名】 仲 真理子
【特許出願人】
 【識別番号】 000000033
 【氏名又は名称】 旭化成株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100090941
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 藤野 清也
【選任した代理人】
 【識別番号】 100076244
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 藤野 清規
【選任した代理人】
 【識別番号】 100113837
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 吉見 京子
【選任した代理人】
 【識別番号】 100127421
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 後藤 さなえ
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 014834
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1
 【物件名】 図面 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

ポリアルキレングリコールを介して磁気ビーズを結合させた被検物質に対する特異的結合物質を磁気ビーズ標識化特異的結合物質として使用し、被検物質と磁気ビーズ標識化特異的結合物質とを反応させ、被検物質に結合した磁気ビーズ標識化特異的結合物質からの磁気シグナル、または被検物質に結合しなかった磁気ビーズ標識化特異的結合物質からの磁気シグナルを、磁気センサーを用いて検出することを特徴とする特異的結合を用いた測定方法。

【請求項 2】

磁気センサーが磁気抵抗素子センサーである請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

磁気センサーがホール素子センサーである請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

磁気ビーズとポリアルキレングリコールの結合部がアビジン-ビオチン結合である請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

被検物質が抗原であり、磁気ビーズ標識化特異的結合物質が磁気ビーズ標識化抗体である請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

ポリアルキレングリコールを介して磁気ビーズによって標識化され、被検物質と特異的に結合し、磁気センサーにて検出されうる磁気ビーズ標識化特異的結合物質を含む特異的結合の測定診断キット。

【請求項 8】

被検物質が抗原であり、磁気ビーズ標識化特異的結合物質が磁気ビーズ標識化抗体である請求項7に記載の診断キット。

【請求項 9】

ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである請求項7又は8に記載の診断キット。

【請求項 10】

磁気ビーズとポリアルキレングリコールの結合部がアビジン-ビオチン結合である請求項7～9のいずれかに記載の診断キット。

【請求項 11】

ポリアルキレングリコールを介して磁気ビーズで標識化し、磁気センサーで検出されうる抗体。

【請求項 12】

ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである請求項11に記載の抗体。

【請求項 13】

磁気ビーズとポリアルキレングリコールの結合部がアビジン-ビオチン結合である請求項11又は12に記載の抗体。

【請求項 14】

磁気ビーズの大きさが粒径 $0.5 \sim 10 \mu\text{m}$ である請求項11～13のいずれかに記載の抗体。

【書類名】明細書

【発明の名称】磁気ビーズを用いた被検物質の測定方法及びこれに用いる磁気ビーズ標識化抗体

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、試料中の被検出物質の有無あるいは量を高感度かつ簡便に検出・測定する新規測定技術に関する。さらに詳しくは、信号検出手段としての磁気センサーを用い、ポリアルキレングリコールを介して磁気ビーズを被検物質に対する特異的結合物質に結合したものを標識化特異的結合物質として使用する新規なイムノアッセイに関する。本発明は生命科学分野、特に医療分野、臨床検査分野において有用である。

【背景技術】

【0 0 0 2】

イムノアッセイ（免疫測定法、免疫定量法ともいう。）など抗体を用いた、抗原の検出に、磁気ビーズに結合させた抗体を用いる方法は、従来から知られている。例えば、イムノアッセイの場合、そのほとんどは磁気ビーズに結合した抗体をサンドイッチ法イムノアッセイの1次抗体として用い、磁石により簡便に1次抗体に結合した抗原、及び抗原を介して結合した蛍光、酵素などで標識された2次抗体を回収し、BF分離を行うためのものであった。以下に磁気ビーズを利用した本発明に関連する先行イムノアッセイ技術を説明する。

【0 0 0 3】

特許文献1にはデキストラン被膜された磁気粒子と別のマイクロビーズに結合した抗体によるサンドイッチ法イムノアッセイ技術が開示されているが、磁気粒子は抗原を介して結合している免疫サンドイッチ複合体を特定の場所に磁力で引き寄せるため用いられており、磁気粒子が2次抗体として検出に用いられているものではない。また、特許文献2、特許文献3には磁気粒子および磁気センサーを用いた目的物質量の測定法に関する技術が開示されているが磁気粒子への抗体結合方法については具体的な方法は開示されていない。

【0 0 0 4】

T. AyturらはCMOSホール素子センサーを用いた磁気ビーズを用いた免疫複合体検出技術を非特許文献1に開示しているが、磁気ビーズには抗体は直接固定化されておらず、磁気ビーズで標識化された2次抗体を用いたサンドイッチイムノアッセイの形態を取ったものではなかった。

【0 0 0 5】

2次抗体の標識化に用いることが可能であると思われる磁気ビーズは磁気シグナル検出に用いられる関係上、サイズが大きいほど検出感度の上で有利である。現在イムノアッセイに用いられている磁気ビーズは、前述のようにほとんどの場合1次抗体の固定基材としてBF分離を簡単に行う手段として用いられることから、より強い磁性体である必要がある。このことから、市販されている磁気ビーズは通常のイムノクロマトグラフィーなどに用いられるラテックス、ポリスチレンビーズに較べると直系で数倍から10倍以上大径である。実際に粒径がそろった磁気ビーズとしては最小で約0.5 μ m、通常は0.5から10 μ m程度のサイズであることが一般的である。

【特許文献1】特開平4-323560号公報

【特許文献2】米国特許第6046585号明細書

【特許文献3】米国特許第6518747号明細書

【非特許文献1】Solid-State Sensor, Actuator and Microsystems Workshop, June 2-6, 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 6】

磁気ビーズによって標識化された抗体を2次抗体として用いる免疫磁気センサー測定に

においても、前述のごとく磁気シグナルをセンシングする関係上、 $0.5\mu\text{m}$ 以上の大径で、かつ磁気の由来である鉄分の影響により比重も相対的に重い磁気ビーズを2次抗体に結合して、これを免疫反応に使用する必要があるという問題があった。そして、この問題はイムノアッセイの場合だけでなく、その他の特異的結合を用いた測定方法の場合でも同様の問題点である。 $0.5\mu\text{m}$ 以上のサイズの磁気ビーズを、2次抗体などの標識用ビーズとして用いる場合、磁気センサーによるセンシングには好適である。しかし、一方で、ビーズの巨大なサイズと比重の影響により、通常の蛍光標識、酵素標識あるいはイムノクロマトグラフィーの2次抗体に用いられるラテックス又はポリスチレンビーズなどの場合に較べて、磁気ビーズ標識化抗体あるいは特異的結合物質の運動性、拡散性は極端に低く、その結果として極端に特異的結合反応のスピードが低下し、感度が維持できないという問題点があった。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、ポリアルキレングリコールを介して被検物質に対する特異的結合物質が磁気ビーズと結合した標識化特異的結合物質を用いることにより、磁気ビーズ標識化した特異的結合物質と被検物質との反応時間が短縮を可能とするとともに、特異的免疫結合反応が高感度化されるとともに磁気ビーズセンサーによりシグナルを検知することにより、測定対象物質のさらなる高感度検出を可能とするものである。すなわち、本発明は、以下の構成を有する。

(1) ポリアルキレングリコールを介して磁気ビーズを結合させた被検物質に対する特異的結合物質を磁気ビーズ標識化特異的結合物質として使用し、被検物質と磁気ビーズ標識化特異的結合物質とを反応させ、被検物質に結合した磁気ビーズ標識化特異的結合物質からの磁気シグナル、または被検物質に結合しなかった磁気ビーズ標識化特異的結合物質からの磁気シグナルを、磁気センサーを用いて検出することを特徴とする特異的結合を用いた測定方法。

(2) 磁気センサーが磁気抵抗素子センサーである上記(1)に記載の方法。

(3) 磁気センサーがホール素子センサーである上記(1)に記載の方法。

(4) ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである上記(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 磁気ビーズとポリアルキレングリコールの結合部がアビジン-ビオチン結合である上記(1)～(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 被検物質が抗原であり、磁気ビーズ標識化特異的結合物質が磁気ビーズ標識化抗体である上記(1)～(5)のいずれかに記載の方法。

(7) ポリアルキレングリコールを介して磁気ビーズによって標識化され、被検物質と特異的に結合し、磁気センサーにて検出されうる磁気ビーズ標識化特異的結合物質を含む特異的結合の測定診断キット。

(8) 被検物質が抗原であり、磁気ビーズ標識化特異的結合物質が磁気ビーズ標識化抗体である上記(7)に記載の診断キット。

(9) ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである上記(7)又は(8)に記載の診断キット。

(10) 磁気ビーズとポリアルキレングリコールの結合部がアビジン-ビオチン結合である上記(7)～(9)のいずれかに記載の診断キット。

(11) ポリアルキレングリコールを介して磁気ビーズで標識化し、磁気センサーで検出されうる抗体。

(12) ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである上記(11)に記載の抗体。

(13) 磁気ビーズとポリアルキレングリコールの結合部がアビジン-ビオチン結合である上記(11)又は(12)に記載の抗体。

(14) 磁気ビーズの大きさが直径 $0.5\sim 10\mu\text{m}$ である上記(11)～(13)に記載の抗体。

【発明の効果】

【0008】

本発明を採用することにより、磁気ビーズ標識化抗体あるいは特異的結合物質の、被検物質との反応速度を向上させることができ、かつ、高感度な磁気センシングによる高感度磁気センサー測定の実現可能とすることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明について被検物質及び特異的結合物質として抗原と抗体を用いた場合を例にとって詳細に説明するが、本発明は免疫反応にのみ限定されるものではなく当然、相補的DNA結合を用いた特異的DNA配列の検出などその他の種々の特異的結合に適用することができる。

本発明は、特にイムノアッセイ分野においては2次抗体、2次抗体の標識化合物である磁気ビーズ及び2次抗体を磁気ビーズと結合させるポリアルキレングリコールからなる磁気ビーズ標識化2次抗体を免疫反応にもちい、抗原を介して1次抗体あるいはその結合基盤との間で形成される磁気標識化免疫サンドイッチ複合体の磁気標識量を磁気センサーで検出することにより抗原の有無及び量を検出する新規なイムノアッセイに適用することが可能である。

【0010】

本発明で2次抗体と磁気標識用磁気ビーズ間の結合に用いられるポリアルキレングリコールは、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど種々の該当する化合物が挙げられるが、その中でも特に、ポリエチレングリコールが好ましく用いられる。

【0011】

ポリアルキレングリコール（以下、PALGと省略することがある）は、磁気ビーズに結合する抗体との間の直鎖上の親水性スパーサーとして機能するものであり、これらの化合物を介して2次抗体に磁気ビーズを結合させることにより抗体が反応液中でより自由に稼動可能となり、2次抗体としての反応性が増大し、結果的に、磁気ビーズで標識された2次抗体の免疫反応速度を飛躍的に向上することができる。これにより、磁気ビーズが大きく、また比重が大きい場合であっても、従来の検出感度を維持しつつ、抗原と2次抗体の免疫反応速度を向上することができる。また、今後、磁気ビーズの小径化が進んだ場合は、小径化による抗体の移動自由度の増大と相俟って、より一層抗原と抗体の反応速度は向上することになる。

【0012】

ポリエチレングリコール（以下、PEGと省略することがある）と磁気ビーズ間の結合には磁気ビーズ表面のCOOH基やNH₂基を利用した共有結合法が利用されうるがさらに好適にはビオチン化されたPEGとアビジン化磁気ビーズを用いてアビジン-ビオチン結合により磁気ビーズを2次抗体に標識するのが望ましい。さらに、非特異吸着の少ないPEGを介して磁気ビーズと2次抗体を結合することにより磁気ビーズ基材の基盤や1次抗体への非特異吸着特性を抑制することが可能であり、抗体の反応性向上とあわせて磁気ビーズ標識化2次抗体反応の免疫反応S/N向上効果に寄与する。

【0013】

本発明に使用されるPEGの分子量は種々の範囲のものが使用可能であるが、比較的分子量の小さいMW3000前後のPEGでも十分に磁気ビーズ標識化2次抗体の反応性向上の効果を発揮することが可能である。

【0014】

本発明に用いることのできる磁気ビーズとは、少なくとも外部から磁石を作用させている間は磁化する粒子であれば良い。この磁気ビーズとしては、強磁性体を単独で粒子状に成形した粒子；強磁性体を核としてその表面をポリスチレン、シリカゲル、ゼラチン、若しくはポリアクリルアミドなどの高分子物質で被覆した粒子；ポリスチレン、シリカゲル、ゼラチン、若しくはアクリルアミドなどの高分子物質の粒子を核として強磁性体を被覆した粒子；又は赤血球、リポソーム若しくはマイクロカプセルなどの閉じた袋状の物質

に強磁性体を封入した粒子等を挙げる事ができる。なお、前記の強磁性体としては、例えば、鉄、コバルト、若しくはニッケル等の強磁性金属；前記 強磁性金属を含む合金；非磁性体中に前記強磁性金属若しくは前記強磁性金属を含む合金を含有するもの；又は前記強磁性金属中若しくは前記強磁性金属を含む合金中に非磁性体を含有するもの等を挙げる事ができる。なお、この磁気ビーズは、一般的に超常磁性体といわれるもので、外部から磁石を作用させている間は磁化し、外部からの磁石の遮断により 速やかに減磁する性質を持つものであることが特に好ましい。そのような磁気ビーズとしては、例えば、DynaI社製Dynabeads M-450、M-270、Myone、Seradyn社製Sera-mag等が挙げられるがこれらに限定されるものではない。

【0015】

磁気ビーズの粒子径は、小さいと磁性体含有量の絶対量が少なくなることから磁気センサーで十分な感度が得られない。従って、本発明の磁気ビーズの粒子径0.1～10 μ mであり、好ましくは0.5～10 μ mである。また、粒子の形状は特に限定されるものではなく、球状、多面体形状とすることができる。

【0016】

本発明の磁気シグナル検知用の磁気センサーは、市販されている通常の磁気センサーを使用することが出来る。例えば、ホール素子、半導体MR素子（SMR素子）、GMR（Giant magnetoresistance）素子等である。同センサーは被検出物質の数、検出方法に応じて、単独で用いてもいいし、複数個を配置して用いることも出来る。また場合によっては、各素子を微小化して、これらをアレー状に配置して測定することも出来る。採用されるセンサーチップは、被検出物質に応じた感度、同チップのコスト、測定の信頼性、安定性等を考慮して選択される。これらを考慮した場合、本発明では半導体SMR素子が好ましい磁気センサーとして推奨される。

【0017】

本発明と組み合わせて用いられる1次抗体の固相化用基盤は一般的にイムノアッセイ用1次抗体吸着基盤として用いられるポリスチレン、ポリジメチルシロキサンコートシリコン、ニトロセルロース、ガラス繊維などさまざまな材料が使用可能であり、また抗体のNH₂残基、COOH残基、SH基などを利用した共有結合法によりさらに多様な材料に1次抗体を固定化することが可能であり、それら官能基を介して1次抗体を結合可能なさまざまな材料が1次抗体用基盤として使用することができる。

【0018】

また、本発明による磁気ビーズ標識化試薬を含む診断キットは、一般的なサンドイッチ法イムノアッセイ診断キットとして液状の磁気ビーズ標識化試薬形態により使用することが可能であるが、グラスファイバーその他の乾燥用担体上に当該標識化磁気ビーズを乾燥・固化して適切な溶媒により反応直前に溶解・液状化したのちに使用することも可能である。

【0019】

本発明によって提供される高感度な新規イムノアッセイ技術は種々の抗原の定性・定量イムノアッセイに応用することが可能である。特にイムノアッセイによる血液、各種体液およびぬぐい液等に含まれる抗原検査などの医療診断、検査薬領域に好適な技術として適用することができる。

以下、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0020】

[PEG鎖を介した磁気ビーズによる抗肺炎球菌2次抗体の標識化]

まず、PEG鎖を介した磁気ビーズによる抗肺炎球菌2次抗体の標識化の最初のステップとしてBiotin-PEG-CO₂-NHS（シェアーウオーター社、MW3400）を用いて抗体にPEG鎖を結合させる。Biotin-PEG-CO₂-NHS（シェアーウオーター社、MW3400）試薬6.8mgを計量し、100 μ lの蒸留水に溶解し、20mM水溶液を作成する。Anti-C-polysaccharide抗体（スタッテン

ツセルミンスタット社、ウサギポリクローナル抗体) のproteinGカラム (ファルマシア社製) 精製抗体画分をPBSに脱塩、バッファー交換したもの (抗体濃度9.26mg/ml) 108 μ l と先に調整したBiotin-PEG-CO₂-NHS 20mM水溶液3.3 μ lとを混合し、室温で2 h r 反応させる。

【0 0 2 1】

上記反応液を遠心型限外ろ過膜 (アミコン社、分子量3万カット) によって回転数7500回転で10分間濃縮し、さらに濃縮液にPBS3mlを添加し、同条件により脱塩・洗浄を3回繰り返す。得られたPEG-biotin標識化抗体液の分子あたりのBiotin標識率をEZ-link Sulfo-NHS-Biotinylation_Kit試薬 (ピアース社) 中のbiotin定量試薬により定量したところ抗体1分子あたりのbiotin標識数は2.8分子であった (IgG濃度は3mg/ml)。

【0 0 2 2】

次に、DynabeadsM-270_streptavidin (Dynal社製、直径2.8ミクロン) の1%PBS溶液を100 μ Lをエッペンドルフチューブで計量し、それに前記のbiotin-PEG化抗体溶液を33 μ l添加し、さらに、PBS 367 μ lでトータル液量500 μ lにメスアップしたのち、室温で1時間攪拌しながら反応を行った。この反応で得られた磁気ビーズ標識化2次抗体液からDynal社製固定磁石を用いて磁気ビーズ標識化2次抗体のみ回収し、上澄みを除去した。

【0 0 2 3】

さらに、PBS 1mlを添加し同様な操作でPEG鎖を介した磁気ビーズ標識化2次抗体のみを回収・洗浄し最終的に1%BSA/PBS溶液に調整したビーズを0.5%濃度になるように溶解した。

以上のようにして調整したPEG鎖を介した磁気ビーズ標識化2次抗体を実施例2のイムノアッセイ試験に供した。

【0 0 2 4】

また、比較試験用として、PEGを介さずに同じ磁気ビーズ (DynabeadsM-270_streptavidin) を2次抗体に結合させたビーズの調整も実施した。この場合、ピアース社製のEZ-link Sulfo-NHS-Biotinylation_Kit試薬を用いて仕様書の説明に従い2次抗体のビオチン化を行った。具体的には先に使用したAnti-C-polysaccharide抗体 (スタッテンツセルミンスタット社、ウサギポリクローナル抗体) のproteinGカラム (ファルマシア社製) 精製抗体画分をPBSに脱塩、バッファー交換したもの (抗体濃度9.26mg/ml) 1mlに、20mg/mlのSulfo-NHS-Biotin水溶液を20 μ l加え室温にて30分反応させた。得られた反応液をキットに添付のD-salt Dextran Desalting Columnにて3倍ベットボリユームのPBS溶媒にて脱塩置換する。得られたビオチン化抗体の分子あたりのBiotin標識率をキット付属のbiotin定量試薬により定量したところ抗体1分子あたりのbiotin標識数は3.5分子であった (IgG濃度は4mg/mlであった)。

【0 0 2 5】

次に、DynabeadsM-270_streptavidin (Dynal社製、直径2.8ミクロン) の1%PBS溶液を100 μ lをエッペンドルフチューブに計量し、それに前記のbiotin-化抗体溶液を25 μ l添加し、さらにPBS 375 μ lでtotal液量500 μ lにメスアップしたのち、室温で1時間攪拌しながら反応を行った。この反応で得られた磁気ビーズ標識化2次抗体液からDynal社製固定磁石を用いて磁気ビーズ標識化2次抗体のみ回収し、上澄みを除去した。

【0 0 2 6】

さらに、PBS 1mlを添加し同様な操作で磁気ビーズ標識化2次抗体のみを回収・洗浄し最終的に1%BSA/PBS溶液に調整したビーズを0.5%濃度になるように溶解して比較試験用のPEG鎖を持たない磁気ビーズ標識化2次抗体試薬を得た。

【実施例 2】

【0 0 2 7】

[磁気ビーズ標識化2次抗体によるイムノアッセイと磁気抵抗素子センサーによるシグナルの検出]

ポリスチレン平板 (面積先1cm角、厚み1mm) 上に、0.1Mの磷酸ナトリウムbuffer (pH 7) に10 μ g/ml濃度になるよう溶解したAnti-C-polysaccharide抗体 (スタッテンツセルミ

ンスタット社、ウサギポリクローナル抗体のproteinGカラム精製抗体画分)を50 μ lスポットし、室温・湿潤箱中にて1時間反応させた。蒸留水にて平板表面を洗浄後、1%牛血清アルブミンの0.1Mの燐酸ナトリウムbuffer (pH7) 溶液50 μ lをスポットしさらに室温・湿潤箱中にて1時間反応させた。蒸留水にて平板表面を洗浄し10分間ドラフトにて表面を風乾後、いろいろな濃度のC-polysaccharide抗原の生理食塩水希釈液を1次抗体固定化位置内に20 μ lスポットし室温にて10分間反応させた。再び蒸留水にて表面を洗浄し、ペーパーパッドにて軽く表面の水分をふき取った。

【0028】

次に、抗原が補足された平板表面部に実施例1で調整した2種類の方法で調整した磁気ビーズ標識化2次抗体の0.5%溶液を10 μ lスポットし、室温にて10分間反応させた。反応終了後の平板表面を結合したビーズがはがれないように蒸留水でやさしく洗浄し、風乾後ビーズの平板表面への結合状態を斜めからの散乱光存在下での10倍拡大状態のCCDカメラで観察・判定するとともに磁気抵抗素子センサーにより平板表面の残存磁気を測定し、磁気シグナルの強度比較測定した。これらの測定結果を表1、表2に示す。

【0029】

尚、磁気抵抗素子センサーの測定は特願2003-427146号に記載の磁気抵抗素子センサーを用いた磁気測定装置の試料設置部位に反応終了後のポリスチレン平板を設置したのち、当該明細書実施例に記載の条件により実施した。

即ち、図1に示す磁気測定装置及び図2に示す信号処理装置により測定した。図1は本発明のシグナル検知システムの実施形態を模式的に示した図である。101は二次元回転中心を示し、102は回転中心101に対して法線方向に磁界を発生する磁場発生装置である。103は磁場発生装置102によって生じる磁場に対して垂直に設置された磁気センサーである。104は磁気センサー103と磁気を測定する試料105を平行に対峙させるための試料設置台である。106は磁場発生装置102と磁気センサー103が固定され二次元回転中心101を持つ固定テーブルである。107は試料設置台104が固定され二次元回転中心101を中心に回転可能な回転テーブルである。回転テーブル107は回転中心101を中心として駆動機能1030、及び駆動回転中心1010、駆動伝達機能1020によって固定テーブル106と二次元同心円状に相對運動可能である。

【0030】

本実施例で利用した磁気測定装置の詳細は、永久磁石を内蔵した磁気センサーとして村田製作所製磁気抵抗素子BS05を用い、SUS304で作成した固定テーブルに設置した。アルミ製の回転テーブルにプラスチック製の試料設置台を固定し、試料と磁気センサーの二次元同心円状の相對運動を実現した。増幅器は株式会社村田製作所技術資料に開示されているものを用い電圧増幅率10万倍となるよう回路定数を決定した。信号処理装置として、岩通計測製DS-4264デジタルオシロスコープを用いた。また、駆動機能及び駆動伝達機能はオリエンタルモーター及びタイミングベルトによって50RPMで実施した。

【0031】

図2は、本発明の実施例2におけるシグナル検知システムの処方の結果を示した図であり、磁気センサーからの磁気測定信号を利用可能な形態に変換する信号処理装置、および磁場発生装置および磁気センサーに対して、試料が選択された回転中心を中心として二次元同心円状に回転運動可能な駆動機能を制御する為のブロック図の実施形態である。

増幅器201は、磁気センサーの出力信号を増幅するものである。センサーの種類によって、電流増幅または電圧増幅を使い分けることができる。位置検出手段202は必須のものではないが、たとえば信号処理において平均化処理等の手法を採ったり、試料位置に同期させて信号を取り込むといった信号対雑音比の向上を図る場合は設置することが好ましい。位置検出手段としては、二次元回転中心や回転テーブルに取り付けた磁石を検知する磁気センサー、二次元回転中心や回転テーブルに取り付けたマーカを検知する光学センサー、二次元回転中心や回転テーブルに取り付けた突起を検出するスイッチ等一般的なものが利用可能である。

【0032】

アナログ／デジタル変換手段203は、増幅器201より増幅されたアナログ信号を演算処理及び記憶処理が可能な形態であるデジタル信号に変換する手段であり、一般的な回路が利用可能である。駆動制御機能204は駆動機能を制御するものであって、二次元回転中心や回転テーブルの回転数を制御したり、位置検出手段202と同調して回転数の微調整を行う手段である。

【0033】

中央演算処理装置205は、デジタル化された信号の演算、記憶、表示手段への送信、外部機器との通信を実現するものである。外部機器との通信手段206は、得られた測定結果をコンピューターや可搬型記憶媒体やプリンター等に転送するためのものである。電源207は信号処理装置全体に電源を供給する手段である。表示手段208は処理された信号を可視化する手段で液晶表示、プラズマ表示、発光ダイオード、ネオン管、ブラウン管等が用いられる。

【0034】

記憶媒体209は、信号処理中の信号を一時的に蓄積したり信号処理結果を一時的に蓄積する手段であり半導体記憶素子を用いることが好ましい。記憶媒体の必要に応じ蓄積情報をバックアップするための電池210が必要に応じて採用される。

【0035】

【表1】

| 使用したビーズ | 2次抗体の磁気ビーズ標識化条件 | C-polysaccharide 濃度 | | | |
|--------------------------------|---|---------------------|--------------|-------------|------------|
| | | 1000 ng/ml | 100 ng/ml | 10 ng/ml | 陰性 サンプル |
| DynabeadsM-270 Streptavidin | ビオチン化 PEG 鎖を介した 磁気ビーズによる 2 次抗体 の標識 | ○ | ○ | ○ | × |
| | ビオチンのみを介した磁気 ビーズによる 2 次抗体の標 識 (PEG 鎖なし) | ○ | × | × | × |

【0036】

【表2】

| 使用したビーズ | 2次抗体の磁気ビーズ標識化条件 | C-polysaccharide 濃度 | | | |
|--------------------------------|---|---------------------|--------------|-------------|------------|
| | | 1000 ng/ml | 100 ng/ml | 10 ng/ml | 陰性 サンプル |
| DynabeadsM-270 Streptavidin | ビオチン化 PEG 鎖を介した 磁気ビーズによる 2 次抗体 の標識 | 5V | 3V | 0.7V | 検出限 界以下 |
| | ビオチンのみを介した磁気 ビーズによる 2 次抗体の標 識 (PEG 鎖なし) | 1V | 検出限 界以下 | 検出限 界以下 | 検出限 界以下 |

【産業上の利用可能性】

【0037】

本発明は、高感度な新規イムノアッセイ技術として、種々の抗原の定性・定量イムノアッセイに応用することが可能である。特にイムノアッセイによる血液、各種体液およびぬぐい液等に含まれる抗原検査などの医療診断、検査薬領域に好適な技術として適用することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 8 】

【図 1】 本発明のシグナル検知システムの実施形態を模式的に示した図である。

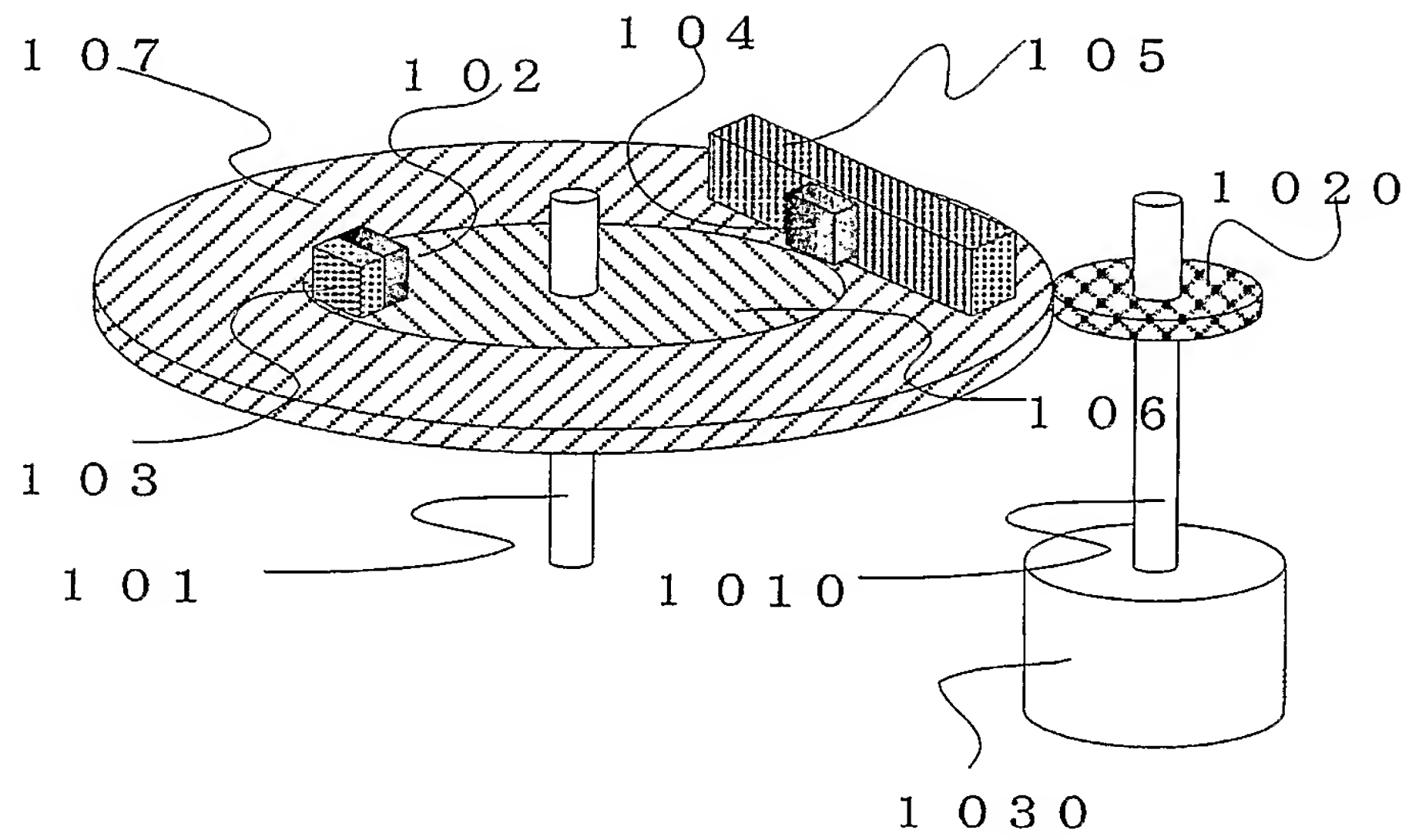
【図 2】 本発明の実施例 2 におけるシグナル検知システムの処方の結果を示した図である。

【符号の説明】

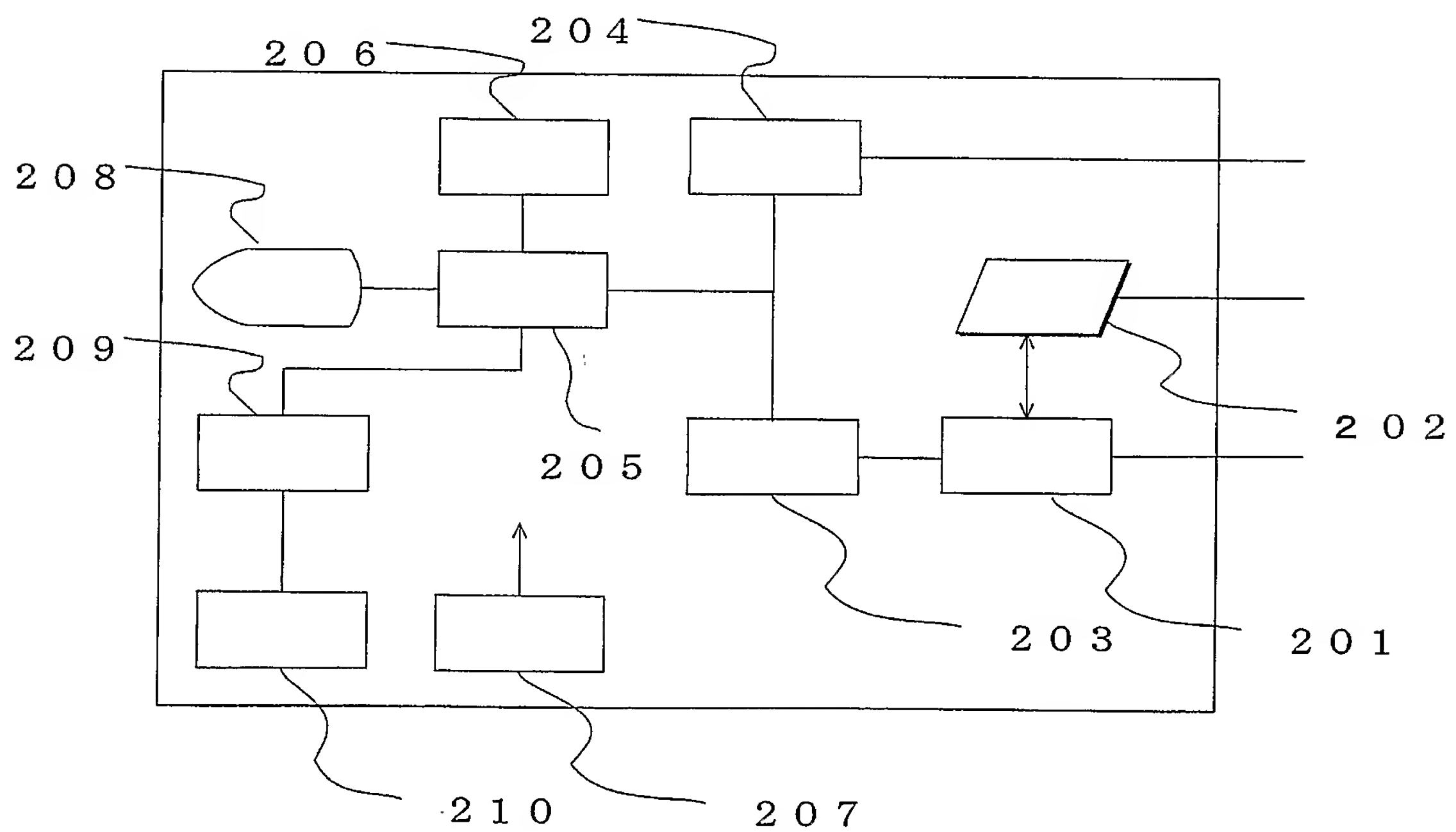
【 0 0 3 9 】

- 1 0 1 二次元回転中心
- 1 0 2 磁場発生装置
- 1 0 3 磁気センサー
- 1 0 4 試料設置台
- 1 0 6 固定テーブル
- 1 0 7 回転テーブル
- 1 0 3 0 駆動機能
- 1 0 1 0 駆動回転中心
- 1 0 2 0 駆動伝達機能
- 2 0 1 増幅器 2 0 1
- 2 0 2 位置検出手段
- 2 0 3 アナログ／デジタル変換手段
- 2 0 4 駆動制御機能
- 2 0 5 中央演算処理装置
- 2 0 6 通信手段
- 2 0 7 電源
- 2 0 8 表示手段
- 2 0 9 記憶媒体
- 2 1 0 電池

【書類名】 図面
【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試料中の被検出物質の有無あるいは量を高感度かつ簡便に検出・測定する新規測定方法を提供する。

【解決手段】 ポリアルキレングリコールを介して磁気ビーズを結合させた被検物質に対する特異的結合物質を磁気ビーズ標識化特異的結合物質として使用し、磁気センサーを用いてシグナルを感知する測定方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

| | |
|---------|--------------------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2 0 0 4 - 0 2 6 2 3 7 |
| 受付番号 | 5 0 4 0 0 1 7 1 8 9 8 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第一担当上席 0 0 9 0 |
| 作成日 | 平成 1 6 年 2 月 4 日 |

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成16年 2月 3日

特願 2 0 0 4 - 0 2 6 2 3 7

ページ : 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 0 3 3]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 1 月 4 日

[変更理由]

名称変更

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜 1 丁目 2 番 6 号

氏 名

旭化成株式会社